

PCT/JP 2004/005515

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

18. 6. 2004

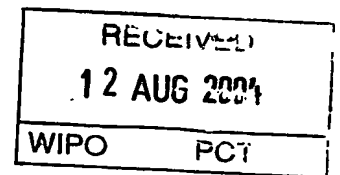
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 2 月 2 7 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 5 4 2 9 5
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 0 5 4 2 9 5]

出 願 人
Applicant(s): 積水化学工業株式会社

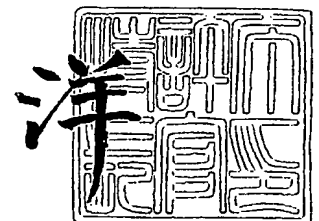


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 7 月 3 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 6 7 6 5 2

【書類名】 特許願
【整理番号】 03P01749
【提出日】 平成16年 2月27日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C01G 49/00
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社内
 【氏名】 岡 孝之
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社内
 【氏名】 大本 泉
【特許出願人】
 【識別番号】 000002174
 【氏名又は名称】 積水化学工業株式会社
 【代表者】 大久保 尚武
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 005083
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

有機高分子物質からなる粒子の内部に平均粒径 1 ～ 3 0 n m の磁性体を分散状態で含有してなり、かつ、粒子表面に抗原又は抗体と共有結合可能な官能基を有するリンカーが結合されていることを特徴とする磁性体内包粒子。

【請求項 2】

磁性体の平均粒径が 1 ～ 1 0 n m であることを特徴とする請求項 1 記載の磁性体内包粒子。

【請求項 3】

官能基は、エポキシ基であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の磁性体内包粒子。

【請求項 4】

リンカーは、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテルであることを特徴とする請求項 1、2 又は 3 記載の磁性体内包粒子。

【請求項 5】

請求項 1、2、3 又は 4 記載の磁性体内包粒子に、前記磁性体内包粒子の粒子表面に結合したリンカーを介して、抗原又は抗体が結合してなることを特徴とする免疫測定用粒子。

【書類名】明細書

【発明の名称】磁性体内包粒子及び免疫測定用粒子

【技術分野】

【0001】

本発明は、均一な磁性を有し、分散安定性に優れ、粒径分布の狭い磁性体内包粒子及びそれを用いる免疫測定用粒子に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、磁性体含有高分子粒子の作製法として（１）作製済みの高分子粒子に鉄イオンを含ませて磁性体を作製する方法、（２）モノマーから高分子粒子を重合する過程で作製済みの磁性体粒子を含ませる方法（特許文献１参照）、（３）別々に作製した高分子粒子と磁性体粒子とを複合化させる方法（特許文献２参照）が知られている。また、この他、（４）磁性体粒子を高分子等で被覆する方法（特許文献３参照）がある。

【0003】

（１）の方法は鉄イオンを高分子粒子に吸収させるため、表面に磁性体が露出し、磁性体が酸化するという課題があった。また（２）の方法は磁性体粒子が均一に高分子粒子に取り込まれないという課題や、粒径の制御が困難で粒径分布の広い物となるという課題があった。また、（３）の方法は高分子粒子が凝集するため、粒径の小さな粒子には使用できないという課題がある。また、（４）の方法は、被覆が均一にできないため、浮遊性や分散性が悪く、また、磁性体粒子表面の一部が露出する場合があった。

【0004】

一方、微量免疫測定法としては、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ等が従来から知られており、既に実用化されている。これらの方法は、それぞれアイソトープ、酵素、蛍光物質を標識として付加した抗原又は抗体を用い、これと特異的に反応する抗体又は抗原の有無を検出する方法である。このような免疫測定法に際して、磁性体内包粒子は、効率よくかつ簡便にＢ／Ｆ分離を行うために用いられている。また、Ｂ／Ｆ分離以外の使用（特許文献４参照）や、磁性体内包粒子自体を標識材料とする免疫測定法（特許文献５、特許文献６、特許文献７参照）が開示されている。

【0005】

【特許文献１】特開平 9-208788 号公報

【特許文献２】特開平 6-231957 号公報

【特許文献３】特開平 6-92640 号公報

【特許文献４】特開 2000-88852 号公報

【特許文献５】特開平 6-148189 号公報

【特許文献６】特開平 7-225233 号公報

【特許文献７】特表 2001-524675 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、上記課題に鑑み、均一な磁性を有し、分散安定性に優れ、粒径分布の狭い磁性体内包粒子及びそれを用いてなる免疫測定用粒子を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、有機高分子物質からなる粒子の内部に平均粒径 1～30 nm の磁性体を分散状態で含有してなり、かつ、粒子表面に抗原又は抗体と共有結合可能な官能基を有するリンカーが結合されている磁性体内包粒子である。

以下に本発明を詳述する。

【0008】

本発明の磁性体内包粒子は、有機高分子物質からなる粒子の内部に平均粒径 1～30 nm の磁性体を分散状態で含有してなるものである。

上記有機高分子物質は、粒子のコアを形成するための疎水性モノマーと、水中で安定に分散する粒子を形成しつつ粒子のシェルを形成するための親水性モノマーとからなる重合体を主構成成分とするものである。

【0009】

<疎水性モノマー>

上記疎水性モノマーとしては、例えば、スチレン、 α -メチルスチレン、p-メチルスチレン、p-クロロスチレン、クロロメチルスチレン等のスチレン系モノマー；塩化ビニル；酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル等のビニルエステル類；アクリロニトリル等の不飽和ニトリル類；メチル（メタ）アクリレート、エチル（メタ）アクリレート、ブチル（メタ）アクリレート、2-エチルヘキシル（メタ）アクリレート、ステアシル（メタ）アクリレート、エチレングリコール（メタ）アクリレート、トリフルオロエチル（メタ）アクリレート、ペンタフルオロプロピル（メタ）アクリレート、シクロヘキシル（メタ）アクリレート、グリシジルメタクリレート、テトラヒドロフルフリル（メタ）アクリレート等のアクリル系モノマー等が挙げられる。これら疎水性モノマーは単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。

【0010】

上記疎水性モノマーとしては、好ましくは、メチル（メタ）アクリレート、エチル（メタ）アクリレート、ブチル（メタ）アクリレート、2-エチルヘキシル（メタ）アクリレート、ステアシル（メタ）アクリレート、エチレングリコール（メタ）アクリレート、トリフルオロエチル（メタ）アクリレート、ペンタフルオロプロピル（メタ）アクリレート、シクロヘキシル（メタ）アクリレート、グリシジルメタクリレート、テトラヒドロフルフリル（メタ）アクリレート等のアクリル系モノマーが用いられる。

【0011】

上記疎水性モノマーとしては、より好ましくは、重合による粒子形成と磁性体形成とを同時進行するため、粒子重合中に高濃度に金属イオンを取り込む能力に優れたグリシジル基を有するアクリル系モノマーが用いられる。上記アクリル系モノマーの中でも、特にグリシジルメタクリレート（GMA）は鉄イオン及びマグネタイトとの親和性が高いため特に好適に使用される。

【0012】

上記疎水性モノマーとしては、架橋性モノマーも使用できる。上記架橋性モノマーとしては、例えば、ジビニルベンゼン、ジビニルピフェニル、ジビニルナフタレン、エチレングリコールジ（メタ）アクリレート、1,6-ヘキサンジオールジ（メタ）アクリレート、ネオペンチルグリコールジ（メタ）アクリレート、トリメチロールプロパントリ（メタ）アクリレート、テトラメチロールメタントリ（メタ）アクリレート、テトラメチロールプロパントテトラ（メタ）アクリレート、ジアリルフタレート及びその異性体、トリアリルイソシアヌレート及びその誘導体等が挙げられる。これら架橋性モノマーは単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。

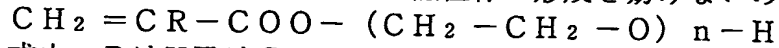
この中でも、エチレングリコールジ（メタ）アクリレートは鉄イオン及びマグネタイトとの親和性が高いため好適に使用される。

【0013】

<親水性モノマー>

上記親水性モノマーとしては、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸、フマル酸、マレイン酸等の重合性不飽和結合を有するカルボン酸；重合性不飽和結合を有するリン酸エステル；重合性不飽和結合を有するスルホン酸エステル；ジメチルアミノエチルメタクリレート4級塩、ジエチルアミノエチルメタクリレート4級塩等のアクリロイル基を有するアミンの塩やビニルピリジン等のビニル基を有する含窒素化合物の塩等のカチオン基を有するビニル系モノマー；2-ヒドロキシエチルメタクリレート、ポリエチレングリコール（メタ）アクリレート、（メタ）アクリルアミド、メチロールアクリルアミド、グリセロールメタクリレート（GLM）等の非イオン性ビニル系モノマー等が挙げられる。これら親水性モノマーは、単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。この中でも

、下記一般式で表されるポリエチレングリコール（メタ）アクリレートは、水中で粒子を安定に分散する能力が高く、磁性体の形成を妨げないので好適に使用される。



式中、RはH又はCH₃を表し、nは2～20の整数を表す。nの好ましい下限は2であり、好ましい上限は10である。

【0014】

上記磁性体は、粒子を形成させる重合過程において粒子内部で金属イオンが酸化して形成したものであるのが好ましい。

<金属イオン>

上記金属イオンは、磁性体を形成するものであれば特に限定されないが、好ましくは、鉄イオン、コバルトイオン、ニッケルイオン等であり、より好ましくは、鉄イオンである。磁性体であるマグネタイトは塩化第2鉄を酸化剤等で酸化して得られる。

【0015】

上記磁性体の平均粒径は1～30nmである。1nm未満であると、磁性体の磁性応答特性が減少する。また、30nmを超えると、粒子内での分散性が低下する。好ましい下限は2nmであり、また、好ましい上限は20nmであり、より好ましい上限は10nmである。

【0016】

本発明の磁性体内包粒子は、上記有機高分子物質からなる粒子の内部に上記磁性体を分散状態で含有している。即ち、本発明の磁性体内包粒子においては、磁性体が粒子表面に露出することなく、粒子内部に分散した状態で存在している。

【0017】

本発明の磁性体内包粒子の磁性体含有量は、その重合組成により0.1～40重量%の範囲で調整するのが好ましい。0.1重量%未満であると、磁性体内包粒子の磁性応答特性が減少し、免疫測定に使用した際の測定感度が低下する。また、40重量%を超えると、粒子の重合操作性が低下し、粒子重合中に金属イオンを取り込み難くなる。好ましい下限は1重量%であり、好ましい上限は30重量%である。

【0018】

また、本発明の磁性体内包粒子は、上記有機高分子物質からなる粒子表面に抗原又は抗体と共有結合可能な官能基を有するリンカーが結合されているものである。

<リンカー>

上記リンカーとは、磁性体内包粒子を免疫測定に使用した際、有機高分子物質からなる粒子と抗原、抗体等の化合物との間に存在することになる化学物質である。上記リンカーは、立体障害が起こらないような長さで、かつ、非特異的吸着が生じにくい化合物であり、有機高分子物質からなる粒子及び抗原、抗体等の化合物と結合する前は、その分子末端に、例えば、アミノ基、カルボキシ基、エポキシ基、トシル基、チオール基等の抗原又は抗体と共有結合可能な官能基を有していることが好ましい。本発明におけるリンカーとしては、粒子表面にグリシジル基含有モノマー由来のエポキシ基、又は、エポキシ基の開環により生じる水酸基、アミノ基等と抗原、抗体等を適当な距離を置いて結合し得るものであれば特に限定されない。好ましくは、エポキシ基を複数末端に有する化合物、例えば、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリプロピレングリコールジグリシジルエーテル、ネオペンチルグリコールジグリシジルエーテル、トリメチロールプロパンポリグリシジルエーテル等が挙げられる。より好ましくは、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテルが挙げられる。

【0019】

本発明の磁性体内包粒子の平均粒径は、その重合条件により0.05～1μmの範囲で調整するのが好ましい。0.05μm未満や1μmを超えると、磁性体内包粒子の粒子形状の制御及び重合操作がしづらくなる。好ましい下限は0.07μmであり、好ましい上限は0.8μmである。

【0020】

本発明の磁性体内包粒子は、内部に磁性体を分散状態で含有する有機高分子物質からなる粒子を製造し、この粒子表面にリンカーを導入することにより製造することができる。内部に磁性体を分散状態で含有する有機高分子物質からなる粒子は、水系溶媒中において疎水性モノマー及び／又は親水性モノマーを重合して粒子を形成する工程と、上記粒子中に金属イオンを取り込みながら上記金属イオンを酸化して磁性体を形成する工程とからなり、上記粒子を形成する工程と上記磁性体を形成する工程とを同時に進行させる方法により製造される。

水系溶媒中において疎水性モノマー及び／又は親水性モノマーを重合して粒子を形成する工程においては、重合開始剤が用いられる。

【0021】

<重合開始剤>

上記重合開始剤としては特に限定されず、例えば、水溶性の有機アゾ化合物、無機過酸化物、有機過酸化物等が挙げられる。

上記重合開始剤の好適な例としては、過硫酸カリウム（以下「KPS」と記す；重合温度70℃）、アゾビスアミジノプロパン塩酸塩（重合温度70℃）、2, 2-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジハイドロクロライド（重合温度60℃）が挙げられる。このうち過酸化物系重合開始剤であるKPSは、重合開始とともに2価の鉄イオンの酸化に寄与することが期待され、KPSを用いた場合は、モノマーと鉄イオンによる重合とマグネタイト生成とが同時に進行することが想定される。アゾビスアミジノプロパン塩酸塩及び2, 2-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジハイドロクロライドは酸化力が弱く、2価の鉄イオンの緩やかな酸化反応に関与する重合開始剤となる。なお、アゾビスアミジノプロパン塩酸塩としては、商品名「V-50」（和光純薬工業社製）が、2, 2-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジハイドロクロライドとしては、商品名「VA-044」（和光純薬工業社製）が市販されている。

上記重合開始剤は、 Fe^{2+} の酸化により消費されたり、 Fe^{3+} によってラジカル活性を失う場合があるため、粒子成長を促す目的で、粒子成長過程に後添加することが有効である。この場合、新たな2次粒子は形成されず、粒子表面がポリマーで被覆される。

【0022】

<pH調整剤>

本発明において、重合と同時に磁性体を作製するためには、重合系内のpHは塩基性に調整されるのが好ましい。上記重合開始剤としてKPSを用いた系では、水中での分散安定性がよく粒径分布の狭い単分散粒子が得られるというメリットがあるが、酸化力の制御ができず重合系内が酸性になるために磁石への引き寄せられ方の弱い粒子になるというデメリットがある。一方、上記重合開始剤として酸化力を持たない2, 2-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジハイドロクロライドを用いた系では、重合系内のpHがほぼ中性であるというメリットがある。

重合系内のpHを弱塩基性に保つには、一般的な塩基を使用することができる。

好ましくは NH_4OH がpH調整剤として使用される。上記pH調整剤は、必要に応じて数回添加することができる。

【0023】

<重合方法>

上記有機高分子物質からなる粒子は、懸濁重合、分散重合、乳化重合、ソープフリー乳化重合等の粒子重合法により製造できるが、最終的に得られる磁性体内包粒子のCv値は5%以下であることが好ましいので、粒径分布の制御に優れたソープフリー乳化重合により好適に製造される。

以下、ソープフリー乳化重合による粒子の製造方法を例示するが、この方法に限定されるものではない。

【0024】

代表的な重合組成は、以下のとおりである。

親水性モノマー／疎水性モノマーからなるモノマー組成物：3 g

H₂O：100 g

四つ口フラスコに上記モノマー組成物及び水を秤量する。それぞれの口には攪拌棒、還流冷却管を取り付ける。次に、系を恒温槽に入れ、攪拌しながら系内を窒素置換する。恒温槽は、添加する重合開始剤の重合温度に調整するのが好ましく、例えば、重合開始剤としてKPS又はアゾビスアミジノプロパン塩酸塩を用いる場合は70℃とするのが好ましく、重合開始剤として2, 2-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジハイドロクロライドを用いる場合は50～60℃とするのが好ましい。その後、水に溶かした重合開始剤を注射筒で系内に注入する。この時点重合開始とし、所定時間後に注射筒を用いて磁性源となるFeCl₂・4H₂Oの水溶液を注入する。FeCl₂・4H₂Oは重合開始剤の1/3～4倍モルを水5gに溶かしたものを使用する。即ち、重合開始剤により上述のモノマーの重合を開始するとともに2価の鉄イオンの酸化(マグネタイト化)を行うことにより粒子を製造する。

重合は開始から2時間～24時間行うことが好ましい。適度な酸化力を得るために、重合途中にNH₄OHを加えてもよく、更に、重合による粒子の成長を促すために、重合途中に重合開始剤を加えてもよい。この様にして磁性体を分散状態で含有する有機高分子物質からなる粒子を得ることができる。

【0025】

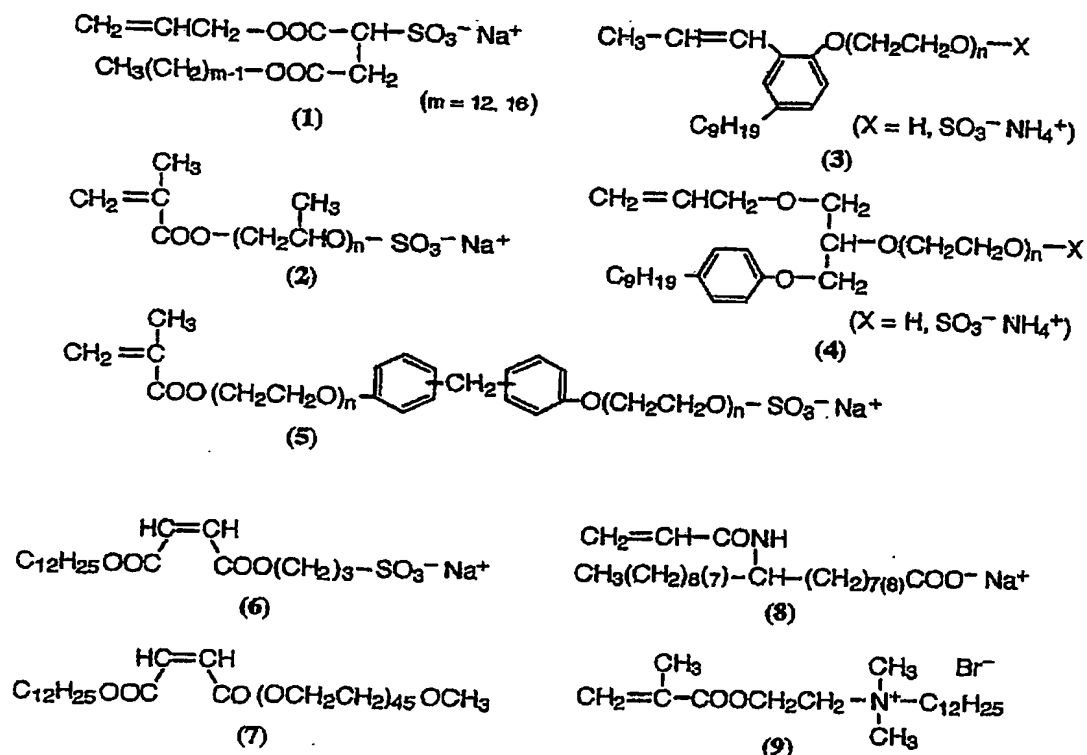
上記モノマー組成物には、共重合モノマーとして反応性乳化剤を添加してもよい。

<反応性乳化剤>

上記反応乳化剤としては、例えば、下記一般式で表される反応性乳化剤類が挙げられる。

【0026】

【化1】



【0027】

これら反応性乳化剤は、単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。製造した粒子は、残存モノマー、重合開始剤、未反応の鉄イオン等を取り除くために遠心分離・再分散を蒸留水で繰り返し行い精製する。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ガラス棒により再分散を行う。精製後、得られた粒

子は、ガラス製バイアルに移し、ふた・パラフィルムで密閉・保存する。

【0028】

作製した粒子表面へのリンカーの導入は、例えば、粒子をアルカリ性水溶液中に分散し、続いて、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル等のリンカーとなる化学物質を加えて、24時間程度混合することによりなし得る。

【0029】

本発明の磁性体内包粒子の表面に導入されているリンカーの官能基と、抗原又は抗体のアミノ基やチオール基等とを化学結合させて、磁性体内包粒子の表面に抗原又は抗体が結合した免疫測定用粒子を作製することができる。このような本発明の磁性体内包粒子に抗原又は抗体が結合している免疫測定用粒子もまた、本発明の1つである。

【0030】

本発明の磁性体内包粒子や免疫測定用粒子は、免疫測定法に用いることができる。上記免疫測定法としては、例えば、磁性体内包粒子を担体として用いたラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ等公知の方法が挙げられ、サンドイッチ法や競合法により、目的とする抗原又は抗体を測定することができる。また、上記方法の標識物質であるアイソトープ、酵素等の代わりに、本発明の磁性体内包粒子を標識として用いることができる。

【発明の効果】

【0031】

本発明の磁性体内包粒子及び免疫測定用粒子は、磁性体を均一に分散含有する粒径分布の狭い粒子であり、かつ、分散安定性に優れているので、本発明の磁性体内包粒子又は免疫測定用粒子を免疫測定に用いることにより、感度がよく精密な測定を行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0033】

(参考例1～7)

200mLの四つ口フラスコに表1に示す各種モノマー及び水90gを秤量した。それぞれの口には攪拌シールと攪拌棒、還流冷却管、セラムラバーを取り付けた。系を70℃の恒温槽に入れ、200rpmで攪拌しながら系内を30分間窒素置換した。その後、水に溶かした重合開始剤であるKPS 0.06gを10gの水に溶解し注射筒で系内に注入した。この時点を重合開始時とし、2分後に注射筒を用いて所定量の $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 水溶液を注入した。重合は重合開始から20時間行った。適度な酸化力を得るために、重合途中に NH_4OH 0.165gを加えた。

作製した粒子は、遠心分離・再分散を蒸留水で4回繰り返し行うことで精製した。この際、遠心分離は20℃、13500rpmで行った。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ガラス棒により再分散を行って磁性体を含有する粒子を得た。

【0034】

【表1】

参考例	GMA	EGDM	AAm	PE-90	PE-350	NE-20	SE-20	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
1	2.835	0.015	0.15	—	—	—	—	0.088
2	2.835	0.015	—	0.15	—	—	—	0.176
3	2.685	0.015	—	0.3	—	—	—	0.176
4	2.835	0.015	—	—	0.15	—	—	0.176
5	2.685	0.015	—	—	0.3	—	—	0.176
6	2.835	0.015	0.05	—	—	0.15	—	0.088
7	2.835	0.015	0.15	—	—	—	0.06	0.176

(単位:g)

【0035】

表中の記載は以下のとおりである。

GMA: グリシジルメタクリレート

EGDM: エチレングリコールジメタクリレート

AAm: アクリルアミド

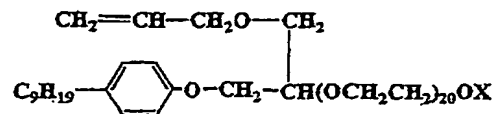
PE-90: ポリエチレングリコールメタクリレート (n=2)

PE-350: ポリエチレングリコールメタクリレート (n=8)

NE-20:

【0036】

【化2】



【0037】

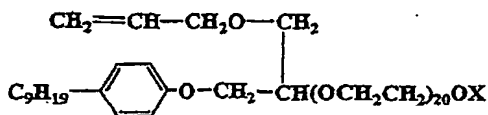
式中、XはHを表す。

【0038】

SE-20:

【0039】

【化3】



【0040】

式中、XはSO₄NH₄を表す。

【0041】

得られた粒子分散液について、目視で粒子の分散状態を観察した。また、精製した粒子を水で希釈し、金属メッシュで支持したコロジオン膜上に沈着固定して、透過型電子顕微鏡(TEM)により、粒子の形態を観察した。

【0042】

参考例1は、一部凝集塊が認められ、時間が経つにつれて粒子が沈降する分散安定性のやや低いものであったため、超音波処理により再分散した。一方、親水性モノマーとしてポリエチレングリコールメタクリレートを用いた参考例2~5、及び、反応性乳化剤を用いた参考例6、7は、いずれも凝集塊が認められず、分散安定性の高い粒子が得られた。特に、反応性乳化剤を用いた参考例6、7は、粒子サイズが小さく、分散安定性が優れていることが認められた。また、参考例1~7の粒子は、いずれも粒子内部に磁性体を分散状態で含み、粒子表面がきれいな輪郭であることが観察された。図1に参考例2の粒子のTEM写真(平均粒径; 粒子0.21μm、磁性体5nm)を示した。

【0043】

参考例1~7で作製した粒子が、磁石へ引き寄せられることを確認するために、1.5mLのマイクロチューブに少量取り、蒸留水で適当に希釈して磁石つきマイクロチューブ立て(DYNAL社製、MPC(登録商標)-M)にチューブを立てて、分散している粒子が磁石に引き寄せられることを目視により確認した。特に、親水性モノマーとしてポリエチレングリコールメタクリレートを用いた参考例2~5は、他の参考例に比べ磁力が大きいたうかがえた。各参考例における粒子の磁性体の平均粒径を表2に示した。

【0044】

【表 2】

参考例	平均粒径(nm)
1	5
2	5
3	6
4	6
5	8
6	3
7	5

【0045】

(参考例 8)

200 mL の四つ口フラスコに下記に示す各種モノマー及び水を秤量した。
 $\text{AAm/GMA/EGDM/H}_2\text{O} = 0.15/2.835/0.015/90$ (g)
 それぞれの口には攪拌シールと攪拌棒、還流冷却管、セラムラバーを取り付けた。系を 70℃ の恒温槽に入れ、200 rpm で攪拌しながら系内を 30 分間窒素置換した。その後、水に溶かした重合開始剤である KPS 0.06 g を 10 g の水に溶解し注射筒で系内に注入した。この時点を重合開始時とし、所定時間後に注射筒を用いて $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.165 g を水 5 g に溶解) を注入した。重合開始 1 分後に適度な酸化力を得るため $\text{NH}_4\text{OH/H}_2\text{O} = 0.165/5$ (g) を加え、2 時間重合を行った。

【0046】

作製した粒子は、遠心分離・再分散を蒸留水で 4 回繰り返し行うことで精製した。この際、遠心分離は 20℃、13500 rpm で行った。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ガラス棒により再分散を行って磁性体を含有する粒子を得た。

【0047】

(参考例 9)

重合開始後、所定時間に下記物質を添加したこと、重合時間が 3 時間であること以外は参考例 8 と同様に磁性体を含有する粒子を得た。

重合開始 30 分後 $\text{NH}_4\text{OH/H}_2\text{O} = 0.165/5$ (g)

重合開始 60 分後 $\text{KPS/H}_2\text{O} = 0.165/5$ (g)

【0048】

(参考例 10)

重合開始後、所定時間に下記物質を添加したこと、重合時間が 3 時間であること以外は参考例 8 と同様に磁性体を含有する粒子を得た。

重合開始 60 分後 $\text{KPS/H}_2\text{O} = 0.165/5$ (g)、 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O/H}_2\text{O} = 0.088/5$ (g)

重合開始 120 分後 $\text{GMA} = 0.5$ (g)、 $\text{NH}_4\text{OH/H}_2\text{O} = 0.165/5$ (g)

【0049】

(参考例 11)

重合開始後、所定時間に下記物質を添加したこと、重合時間が 4 時間であること以外は参考例 8 と同様に磁性体を含有する粒子を得た。

重合開始 1 分後 $\text{NH}_4\text{OH/H}_2\text{O} = 0.165/5$ (g)

重合開始 120 分後 $\text{KPS/H}_2\text{O} = 0.165/5$ (g)

【0050】

参考例 8～11 で得られた粒子に対し、TEM による粒子の形態観察を行なった。
 参考例 9、10 は、いずれも、参考例 8 よりも多くの磁性体を含み、粒径が増大していることが認められた。また、参考例 11 では、内部に参考例 9、10 と同程度の磁性体を含み、粒子表面がきれいな輪郭であることが観察された。

これまでの実験より、粒子成長の速い段階で NH_4OH を加えることは、成長を阻害する要因になっていることが推測された。一方、重合開始剤の後添加は、重合率がほぼ100%になり、また、2次粒子が形成されず粒子表面がポリマーで覆われていることが観察され、有効な手段であることが確認された。各参考例における粒子の磁性体の平均粒径を表3に示した。

【0051】

【表3】

参考例	平均粒径(nm)
8	8
9	8
10	10
11	8

【0052】

(実施例1)

参考例2で作製した磁性体を含む粒子1.0gを10%アンモニア水50mLに投入し、70℃で20時間攪拌した。次いで、イオン交換水を用いて遠心洗浄を3回行い、50mLのイオン交換水に分散させた。続いて、エチレングリコールジグリシジルエーテル30gを添加混合し、水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを11に調整した後、室温で24時間攪拌した。反応後、イオン交換水を用いて遠心洗浄を3回行い、エポキシ基を有するリンカーが結合した本発明の磁性体内包粒子を得た。

【0053】

更に、実施例1で得られた磁性体内包粒子から以下の方法により本発明の免疫測定用粒子を作製した。

(免疫測定用粒子の作製)

実施例1で作製した磁性体内包粒子12mgに0.1Mホウ酸バッファーを1mLを加え、15000rpmにて10分間遠心分離を行い、上清を除去した。得られた沈渣に、0.1Mホウ酸バッファーを380 μL 、抗 α -hCGモノクローナル抗体溶液(5.0mg/mL)を20 μL 加え、十分混和して、室温にて20時間攪拌した。反応液は15000rpmにて10分間遠心分離を行い、未反応の抗 α -hCGモノクローナル抗体を除去した。なお、磁性体内包粒子への抗 α -hCGモノクローナル抗体結合量は、上清の蛋白濃度測定から仕込みの55%であることを確認した。得られた沈渣は100mMリン酸緩衝液(pH7.5)1mLに懸濁させ、再度遠心分離を行った。その沈渣を100mMリン酸緩衝液(pH7.5)に牛血清アルブミンを5%(w/v)の濃度になるように溶解した溶液900 μL に懸濁させ、37℃で1時間攪拌し、ブロッッキング処理を行った。その後15000RPMにて20分間遠心分離を行い、沈渣に0.1Mホウ酸バッファーを1mLを添加し、超音波で分散させた。続いて、100mMリン酸緩衝液(pH7.5)に牛血清アルブミン及びグリセロールを各々5%(w/v)の濃度になるように溶解し、更にアジ化ナトリウムを0.01%(w/v)の濃度になるように溶解した溶液1mLに懸濁させ、免疫測定用粒子を得た。

【産業上の利用可能性】

【0054】

本発明は、上述の構成よりなるので、疎水モノマーと親水性モノマーとを共重合して粒子を形成する反応と、粒子内に金属イオンを取り込ませながら金属イオンを変性して磁性体を形成する反応を同時に行い、磁性体を分散状態で含有する粒子とし、この表面にリンカーを導入することにより、均一な磁性を有し、かつ、粒径分布の狭い磁性体内包粒子を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

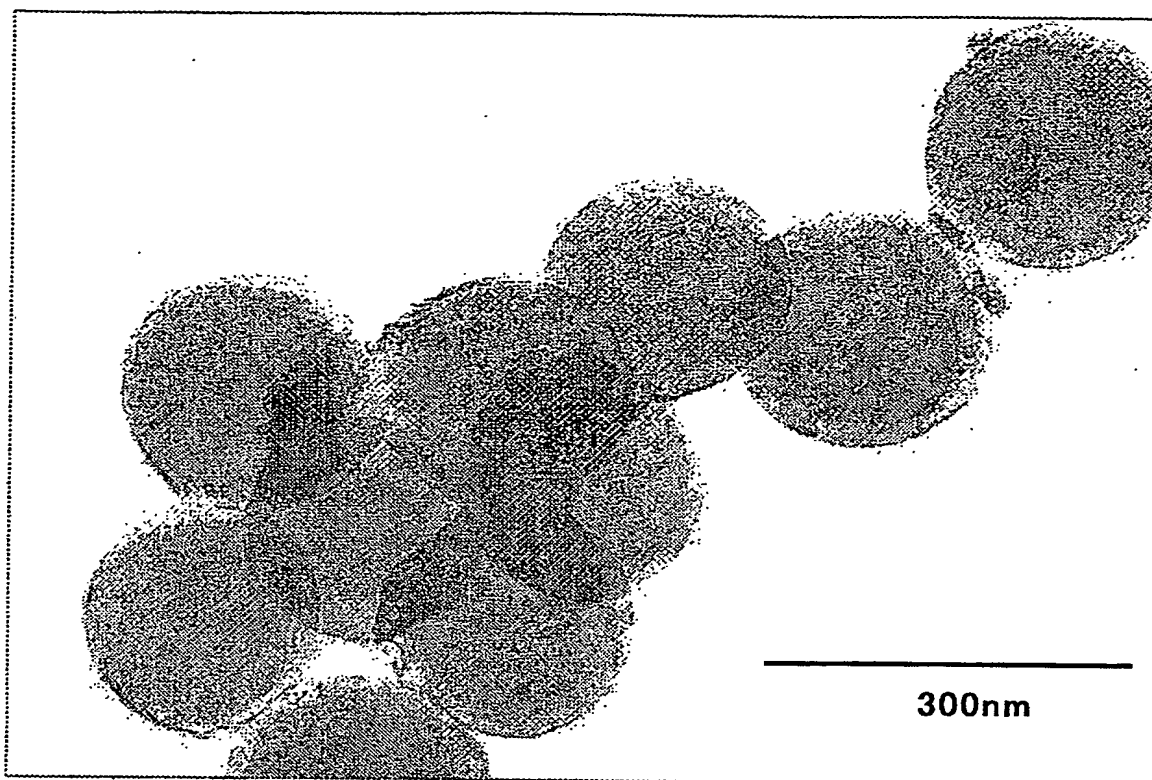
【0055】

【図1】参考例2の粒子(平均粒径;粒子0.21 μm 、磁性体5nm)のTEM写真
出証特2004-3067652

真である。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 均一な磁性を有し、分散安定性に優れ、粒径分布の狭い磁性体内包粒子及びそれを用いてなる免疫測用粒子を提供する

【解決手段】 有機高分子物質からなる粒子の内部に平均粒径 1 ～ 3 0 n m の磁性体を分散状態で含有してなり、かつ、粒子表面に抗原又は抗体と共有結合可能な官能基を有するリンカーが結合されている磁性体内包粒子。

【選択図】 なし

特願 2004-054295

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[000002174]

1. 変更年月日

1990年 8月29日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

氏 名

積水化学工業株式会社